



Potencial biológico de *Beauveria* spp. para el control de *Anthonomus eugenii* en chile dulce*

Biological potential of *Beauveria* spp. for the control of *Anthonomus eugenii* in sweet pepper

Stephanie Quirós-Campos¹, Valerie Salazar-Castillo¹, Alejandro Vargas-Martínez²

* Recepción: 13 de mayo, 2024. Aceptación: 7 de agosto, 2024. Esta investigación formó parte del proyecto: Estrategias de control biológico de *Anthonomus eugenii* y *Neosilba batesi* en el cultivo de chile dulce en la Región Central Occidental, financiado por el Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA).

¹ Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), Departamento de Investigación e Innovación. San José, Costa Rica. mquiros@inta.go.cr (autor para correspondencia, <https://orcid.org/0000-0003-4146-914X>); vsalazarc@inta.go.cr (<https://orcid.org/0009-0005-6883-8840>).

² Universidad Nacional (UNA), Escuela de Ciencias Agrarias. Heredia, Costa Rica. alejandro.vargas.martinez@una.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0001-8039-8984>)

Resumen

Introducción. El *Anthonomus eugenii* provoca considerables pérdidas económicas en el cultivo de chile dulce (*Capsicum annuum*). El control químico es poco efectivo y es indispensable explorar otras alternativas para su manejo. **Objetivo.** Determinar el potencial de cepas de *Beauveria* spp. para el control biológico de *Anthonomus eugenii* en chile dulce en condiciones de invernadero. **Materiales y métodos.** La investigación se ejecutó entre mayo y agosto del 2023 en la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno en Alajuela, Costa Rica, en un invernadero multicapilla de 96 m². Los tratamientos evaluados fueron INTA H-140, INTA H-149, INTA H-168 e INTA H-181 y un testigo absoluto, mediante un diseño completamente aleatorizado (DCA) con tres repeticiones. Se cuantificó el número de adultos vivos y número de chiles infestados cada semana. Se realizó un análisis de correlación de Pearson y un análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo para las variables evaluadas. **Resultados.** Hubo interacción entre los tratamientos y los días después de trasplante (ddt) para el número de adultos vivos ($p < 0,05$). La cepa INTA H-168 redujo significativamente la población de *Anthonomus eugenii* a los 60 ddt y los 64 ddt, con diferencias de 22,96 y 47,15 adultos, respectivamente. Para la variable de número de chiles infestados hubo un efecto individual por ddt ($p < 0,05$). Además, se encontró una correlación positiva entre el promedio de chiles infestados y el número de adultos vivos para los 64 ddt y los 73 ddt ($p < 0,05$). **Conclusión.** La reducción significativa de adultos vivos en las dos primeras evaluaciones de la cepa INTA H-168 y su parasitismo evidencia un potencial biológico para el control de *Anthonomus eugenii*.

Palabras clave: entomopatógeno, biopesticida, parasitismo, biocontrolador.



Abstract

Introduction. *Anthonomus eugenii* causes considerable economic losses in sweet pepper (*Capsicum annuum*). Chemical control is ineffective; therefore, it is essential to explore other management alternatives. **Objective.** Determine the potential of *Beauveria* spp. strains for the biological control of *Anthonomus eugenii* in sweet pepper under greenhouse conditions. **Materials and methods.** The research was conducted between May and August 2023 at the Fabio Baudrit Moreno Experimental Station in Alajuela, Costa Rica, in a 96 m² multispan greenhouse. The evaluated treatments were INTA H-140, INTA H-149, INTA H-168, and INTA H-181, along with an absolute control, using a completely randomized design (CRD) with three replications. The number of live adults and infested peppers were quantified weekly. Pearson correlation analysis and repeated measures ANOVA were performed for the evaluated variables. **Results.** There was interaction between treatments and evaluation date for the number of adults ($p < 0,05$). INTA H-168 strain significantly reduced the *Anthonomus eugenii* population in 60 ddt and 64 ddt evaluations, with differences of 22,96 and 47,15 adults, respectively. For the variable of the number of infested peppers, there was only an individual effect by ddt ($p < 0,05$). Additionally, a positive correlation was found between the average number of infested peppers and the number of live adults for the 64 ddt and 73 ddt ($p < 0,05$). **Conclusion.** The significant reduction in live adults in the first two evaluations of INTA H-168 strain and its parasitism evidence biological potential for the control of *Anthonomus eugenii*.

Keywords: entomopathogen, biopesticide, parasitism, biocontroller.

Introducción

El picudo del chile, *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae), ocasiona importantes pérdidas económicas en el cultivo de chile dulce (*Capsicum annuum*). Su ciclo de vida consta de los estadios de huevo, larva (tres estadios), pupa y adulto, y tiene una duración de cuatro semanas. Sin embargo, puede estar influenciado por condiciones externas como la temperatura y la disponibilidad de hospedantes y alimento (Torres-Ruiz & Rodríguez-Leyva, 2019). Este insecto fue reportado por primera vez en México en 1894, se encuentra distribuido en varios países de continente americano, sin embargo, se ha reportado en países europeos como Italia, Lituania, Eslovenia y Países Bajos (Espinoza-Castillo et al., 2023). Este coleóptero tiene preferencia por el cultivo de chile dulce, sin embargo, su incidencia se ha incrementado en chile picante (*Capsicum chinense*) (Rossini et al., 2020).

Los principales daños que provoca el picudo del chile son la disminución del rendimiento y calidad de los frutos, debido a las cicatrices producidas por la alimentación de los adultos en los botones florales y la parte externa del fruto (Torres-Ruiz & Rodríguez-Leyva, 2019; Van der Gaag et al., 2020). Esta plaga ocasiona caída prematura y necrosis interna de los frutos producto del desarrollo de los instares de larva (Fernández et al., 2020). La ausencia de alimento causa que los adultos se alimenten de hojas y el tallo de la planta, sin embargo, estos hábitos no causan un daño significativo a la plantación (Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá [IDIAP], 2010). La duración del ciclo de una nueva generación es de 20 a 30 días con base en la temperatura (Wu et al., 2019).

Para el manejo de las altas poblaciones del picudo del chile, los productores recurren a aplicaciones continuas de diferentes agroquímicos. El informe de análisis de residuos plaguicidas en fincas del Servicio Fitosanitario (SFE), demostró que no se cumplen los límites de residuos máximos permitidos (LRM). El fipronil es el insecticida con mayor residualidad en fruto, seguido de ingredientes activos como el metamidofós (degradación de acetato o propiamente por el uso directo de metamidofós) y el ometoato (degradación del dimetoato) (Servicio Fitosanitario del Estado [SFE], 2023). La búsqueda de nuevas alternativas para desarrollar estrategias de combate

se direcciona hacia un manejo integrado (Labbé et al., 2020), donde el uso de control biológico representa una opción complementaria.

La capacidad biocontroladora de *Beauveria* spp. (Ascomycota: Hypocreales) se ha estudiado como agente de control de los adultos de muchas de las especies de picudos (Khun et al., 2020), incluso de *Anthonomus eugenii* (Fernández et al., 2020). La principal toxina producida por *Beauveria* spp. es la beauvericina que al ingresar al organismo del insecto provoca mortalidad (Wang et al., 2021; Sharma et al., 2023). No obstante, su viabilidad está influenciada por condiciones abióticas como los rayos ultravioletas, la temperatura, la humedad relativa, las aplicaciones de fungicidas y por los factores bióticos que se relacionan con los insectos hospederos, ya que todos estos elementos influyen en su medio de propagación, dispersión y persistencia (Pucheta Díaz et al., 2006).

En condiciones de laboratorio, se ha demostrado que el crecimiento conidial se detiene a temperaturas iguales o superiores a los 35 °C (Moldovan et al., 2022; Mwamburi et al., 2015; Nussenbaum, 2014), mientras que, Alali et al. (2019) determinaron un descenso de crecimiento de varias cepas de *Beauveria* spp. a temperaturas mayores a 25 °C. Otros estudios, reportaron la existencia de cepas que independiente de los grados centígrados a los cuales son sometidas logran esporulaciones, como se determinó en el estudio de Nussenbaum (2014), con la cepa codificada Bb 301 y temperaturas de 23 °C y en el estudio de Borisade & Magan (2014) con cepas de *Beauveria* spp. capaces de crecer a temperaturas de 35 °C.

Las investigaciones en laboratorio han obtenido resultados satisfactorios; por ejemplo, el Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP, 2010) al evaluar la eficacia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *Anthonomus eugenii*, cuantificaron mortalidades entre un 80 % y 100 % entre los cuatro y siete días después de aplicación, en concentraciones de 1×10^9 conidias/ml. Otra investigación realizada por García-Carrucini et al. (2017), se empleó *Beauveria bassiana*, *Beauveria caledonica*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Purpureocillium lilacinum* con suspensiones de 1×10^6 conidios/ml y se alcanzó una mortalidad del 100 % entre el cuarto y sexto día. Sin embargo, el uso de *Beauveria* spp. dentro de un programa de manejo integrado en campo, es uno de los retos actuales, debido a la influencia que ejercen los factores externos y el manejo convencional.

Una de las alternativas planteadas para el manejo del picudo del chile fue la evaluación de entomopatógenos de los géneros *Metarhizium* spp., *Paecilomyces* spp. y *Beauveria* spp. de la colección del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). Dentro de los resultados obtenidos, Vargas (2021) identificó que los mejores aislamientos fueron los de *Beauveria* spp. Los resultados demostraron que INTA-H-149 e INTA-H-168 eliminaron los individuos a los 6 días de aplicación, mientras que, INTA-H140 e INTA-H181 lograron la mortalidad de los insectos a los 8 días luego de aplicación. El objetivo de esta investigación, fue determinar el potencial de cepas de *Beauveria* spp. para el control biológico de *Anthonomus eugenii* en chile dulce en condiciones de invernadero.

Materiales y métodos

Localización del estudio

La investigación se realizó en la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno (10,006128 N, -84,266821 O), que se encuentra a una altura de 843 m s. n. m., con un promedio de precipitación anual de 1700 mm y está dentro de la zona de vida de bosque húmedo premontano (bh-P) (Ministerio de Ambiente y Energía [MINAE], s.f.). Se utilizó un invernadero multicapilla con apertura cenital de 0,5 m con paredes de malla antiáfidos, techo plástico difuso de 150 MIC, con protección UV y antigoteo con cobertura de color blanco en el suelo. La altura de la estructura utilizada fue de 4 m de alto, con dimensiones de 12 m de largo x 8 m de ancho para un área total de 96 m². La investigación se llevó a cabo en estación lluviosa entre mayo y agosto del 2023.

Tratamientos

Las cepas evaluadas en esta investigación fueron de previo purificadas por cultivo monospórico e identificadas como potenciales en un bioensayo y se encuentran registradas en el Laboratorio de Fitoprotección del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) en Mata Redonda, San José (Vargas, 2021). Se evaluaron cepas de los géneros de *Metarhizium* spp., *Paecylomyces* spp y *Beauveria* spp. El género entomopatógeno con mejor resultado fue *Beauveria* spp. Se determinaron cuatro cepas potenciales, codificadas como: INTA H-140, INTA H-149, INTA H-168 e INTA H-181 (Cuadro 1). Las cepas INTA H-149 e INTA H-168 causaron mortalidad del 100 % a los 6 días de aplicación, mientras que INTA H-140 e INTA H-181 alcanzó esa mortalidad a los 8 días.

Cuadro 1. Cepas potenciales de *Beauveria* spp. para el control biológico de *Anthonomus eugenii* identificadas en el Laboratorio de Fitoprotección del INTA. San José, Costa Rica, Adaptado de Vargas (2021).

Table 1. Potential strains of *Beauveria* spp. for biological control of *Anthonomus eugenii* identified in the Phytoprotection Laboratory of INTA. San José, Costa Rica. Adapted from Vargas (2021).

Código <i>Beauveria</i> spp.	Procedencia (lugar, insecto)
INTA H-140	Desconocido, aislado en <i>Methamasius hemipterus</i>
INTA H-149	Grecia, Alajuela, aislado de hormiga <i>Nylanderia fulva</i>
INTA H-168	Desconocido, aislado de <i>Rhynchophorus palmarum</i>
INTA H-181	Limón, Pococí, aislado de <i>Rhynchophorus</i> spp.

Construcción de jaulas

Para evitar el movimiento de insectos de un tratamiento a otro se construyeron jaulas con malla antiáfidos de 50 mesh (Figura 1A y 1B). Para el sostén de la parte superior de las jaulas se utilizó cable de acero recubierto con pvc y en los laterales con tensores para proporcionar soporte a la malla. Cada jaula tuvo una dimensión de 5 m de largo, 1,5 m de ancho y 2 m de alto. En la parte inferior, la malla fue prensada por adoquines de 8 cm de ancho, 20 cm de largo y 10 cm de alto y sacos tubulares contruidos con tela tropical color negro de 1 m de largo y 15 cm de diámetro rellenos con arena. Los retazos de malla fueron recosidos con una máquina cosedora de sacos y a mano con hilo nylon transparente de 0,3 mm de grosor.

Establecimiento de la plantación

El híbrido de chile dulce (*Capsicum annuum*) utilizado fue PS 16364212 (llamado como 4212). Las plantas de chile dulce, se sembraron a tres ejes en potes plásticos número 1200 color terracota con una mezcla de partes iguales de tierra estéril, peat moss y granza. Se suministraron 16 riegos al día de un minuto de duración mediante sistema por goteo a un caudal de 1 L/h y una presión de 15 PSI. La nutrición de las plantas se realizó por fertirrigación, se mantuvo en un pH de 6,5 con una conductividad de 2 mS/cm y se utilizó la formulación basada en la solución nutritiva de Steiner (1961). Para la preparación de 1000 litros se utilizaron 1065 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 510 g de KNO_3 , 370 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 275 g de KH_2PO_4 , 80 g de NH_4NO_3 y 25 g de elementos menores. No se realizaron aplicaciones de insecticidas, fungicidas o herbicidas para fomentar el establecimiento exitoso de la población de insectos de *Anthonomus eugenii* y de las cepas de *Beauveria* spp.



Figura 1. Construcción de jaulas. a) vista exterior de la instalación de la malla sobre los cables tensores y b) vista interior del área de cada jaula y distribución de las plantas de chile dulce (*Capsicum annuum*) híbrido 4212. Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno. Alajuela, Costa Rica. 2023.

Figure 1. Construction of cages. a) Exterior view of the mesh installation on the tension cables and b) interior view of each replication area and distribution of sweet pepper plants (*Capsicum annuum*) hybrid 4212. Fabio Baudrit Moreno Experimental Station. Alajuela, Costa Rica. 2023.

Establecimiento de la población de insectos

Se recolectaron insectos de *Anthonomus eugenii* en Santiago de Palmares (10,019215 N, -84,445619 O), en una finca donde se identificó prevalencia constante de la plaga estudiada y reporte de daños. Para realizar la captura en campo se utilizaron aspiradores entomológicos. Los insectos fueron trasladados al sitio de investigación el mismo día que fueron recolectados. Para garantizar igual cantidad de machos y hembras en cada repetición se realizó un sexado con un estereoscopio, con base en la metodología detallada por Torres-Ruiz y Rodríguez-Leyva (2019), la cual indica que las hembras exhiben espolones más cortos, delgados y menos curvos que los machos.

Los insectos sexados fueron liberados cuando el cultivo inició floración y fructificación (40 días después de trasplante aproximadamente) para brindarle a la plaga el suministro de alimento (flores, botones florales, hojas y frutos en desarrollo). La liberación de los insectos clasificados consistió en la apertura de los frascos de ambos sexos en cada jaula en horas de la tarde para disminuir el efecto de estrés de los adultos. En cada jaula se liberaron quince insectos, en una proporción de machos y hembras de 40:60 para tener una población de al menos 1 adulto/planta. La liberación de los insectos se realizó 15 días antes de iniciar con las aplicaciones de *Beauveria* spp. para propiciar el establecimiento de la población.

Aplicación de tratamientos

Las cepas de las cuatro *Beauveria* spp. (INTA H-140, INTA H-149, INTA H-168 e INTA H-181) fueron preparadas en medio de cultivo PDA y luego inoculadas en 250 g de arroz en el Laboratorio de Fitoprotección del INTA, San José, Costa Rica. El sustrato de arroz fue conservado en refrigeración a una temperatura de 4 °C durante

su almacenamiento y traslado. A cada cepa de *Beauveria* spp. se le cuantificó la concentración de conidias/ml al momento de su elaboración a nivel de laboratorio en una cámara de Neubauer y todas fueron homogeneizadas a una concentración de 1×10^6 conidias/ml al momento de aplicación.

Los tratamientos evaluados fueron las cuatro cepas de *Beauveria* spp. (INTA H-140, INTA H-149, INTA H-168 e INTA H-181) y un tratamiento testigo que contenía agua + tween 80 al 0,01 %. Se pesaron los gramos requeridos según cepa y con una tela de tergal se procedió a lavar y colar el arroz hasta visualizar su limpieza. Una vez culminado este proceso, se incorporó 0,01 % de tween 80 (0,6 ml) con una jeringa de 1 ml. Las aplicaciones se realizaron con una bomba de aspersión manual de 2 l de capacidad, exclusiva para cada cepa, después de las 4:00 p.m. para evitar exposición del hongo a los rayos solares y altas temperaturas. Se realizó una buena cobertura de tallos, hojas y frutos en todas las plantas de chile dulce.

Diseño experimental y variables evaluadas

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con cinco tratamientos y tres repeticiones. La unidad experimental fue representada por una jaula, en la cual, se establecieron 15 plantas (unidades observacionales) para un total de 45 plantas evaluadas por tratamiento. Para determinar el potencial biológico de cada *Beauveria* spp. se cuantificó el número de adultos vivos de *Anthonomus eugenii* y número de chiles infestados caídos. Las evaluaciones fueron realizadas de tres a cuatro días después de cada aplicación. Las evaluaciones fueron realizadas después de las 10 am donde se observó menos actividad de los adultos de *Anthonomus eugenii* por el aumento de temperatura.

Los frutos con daños no fueron retirados de cada jaula para no interferir la población y emergencia de nuevos adultos, pero fueron colocados sobre un pote con el mismo sustrato utilizado para criar las plantas, con el fin de simular las condiciones de suelo y evitar pudrición más acelerada de estos sobre el suelo del invernadero. En cada evaluación se realizó una búsqueda de insectos parasitados, los cuales se extrajeron y fueron llevados al laboratorio para confirmar la presencia del hongo. Además, al momento de trasplante de las plantas dentro de las jaulas, se instaló un registrador de datos para cuantificar las variables de temperatura y humedad.

Análisis estadístico

Para las variables evaluadas, se realizó un análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo, mediante modelos lineales mixtos. La separación de medias se realizó con la prueba DGC a un nivel de significancia ($\alpha=0,05$). Además, se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson ($\alpha=0,05$) entre el número de adultos vivos y número de chiles infestados. Todos los análisis se realizaron con el software Infostat® (Di Rienzo et al., 2018).

Resultados

Variables de clima

La recolección de datos de las variables climáticas se realizó desde el trasplante de las plantas en las jaulas. La temperatura promedio fue de 25,80 °C y la humedad relativa de 78,19 % durante el periodo de establecimiento de la plaga y evaluación. La temperatura promedio más alta no sobrepasó los 27,31 °C y fue registrada en el mes de agosto de 2023. Se registraron temperaturas máximas de 38,90 °C y mínimas de 17,60 °C (Figura 2A); mientras que el valor máximo para la humedad fue 99 % y el mínimo de 31,30 % (Figura 2B). Los valores promedio de humedad rondaron entre los 65,13 % y los 86,22 %.

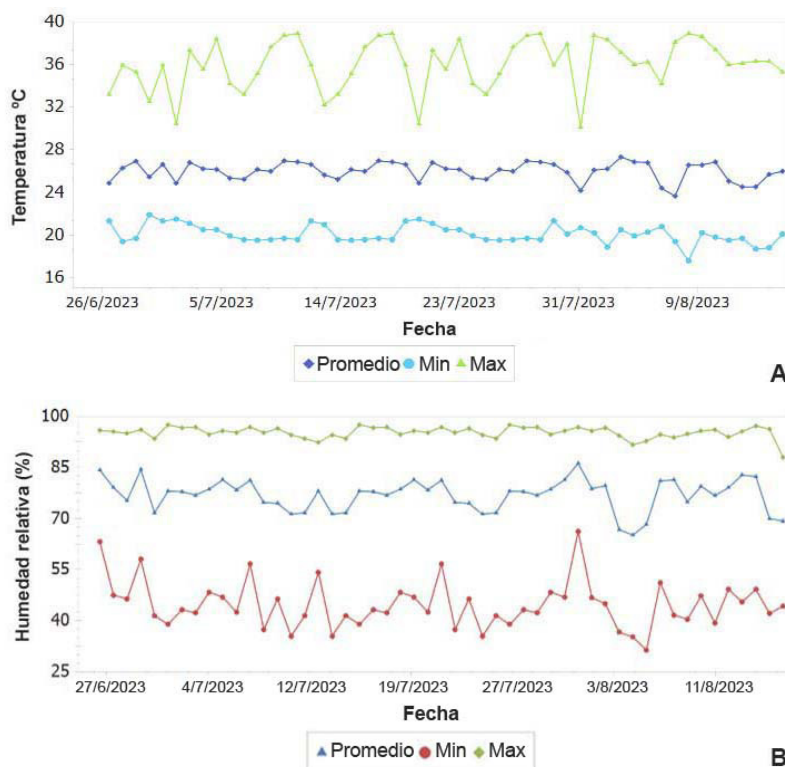


Figura 2. Comportamiento de las variables de clima registradas dentro del invernadero (datos promedio, mínimos y máximos). A) temperatura (°C), B) humedad (%). Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Alajuela, Costa Rica. 2023.

Figure 2. Behavior of climate variables recorded inside the greenhouse (mean, minimum, and maximum data). A) Temperature (°C), B) Humidity (%). Fabio Baudrit Moreno Experimental Station. Alajuela, Costa Rica. 2023.

Número de adultos vivos

Las variables número de adultos vivos y días después de trasplante (ddt) mostraron interacción significativa ($p < 0,05$) ($R^2 = 0,43$) con una disminución en la población de *Anthonomus eugenii* en INTA H-168 durante los 60 ddt y los 64 ddt. La comparación con el testigo muestra que a los 60 ddt, se registró una diferencia significativa de 22,96 adultos, mientras que a los 64 ddt fue de 47,15 adultos. Sin embargo, en las dos evaluaciones siguientes (73 ddt y 78 ddt), no se observaron diferencias significativas (Figura 3).

Número de chiles infestados

Los chiles infestados se caracterizaron por tener al menos una larva dentro de la placenta, sin embargo, hubo chiles con la presencia de varias larvas en diferentes instares, la mayoría en el tercer instar (larva de 6 mm de largo, curvada, apoda, cremosa, cabeza café claro y mandíbulas oscuras). Los frutos cuantificados como infestados fueron chiles inmaduros no superiores a los 20 cm de largo. Las hembras mostraron una preferencia a ovipositar y causar daño en los frutos más pequeños e inmaduros.

Para la variable de número de chiles infestados no hubo diferencias significativas entre cepas, pero sí entre evaluaciones ($p < 0,05$) ($R^2 = 0,69$). El análisis indicó similitud en el número de chiles infestados a los 60 ddt y 73

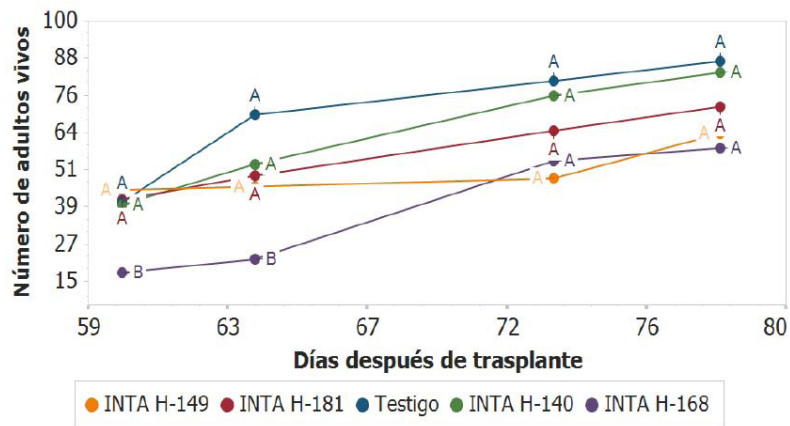


Figura 3. Número de adultos vivos de *Anthonomus eugenii* según cepa de *Beauveria* spp. y días después de trasplante (ddt). Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Alajuela, Costa Rica. 2023.

Medias con una misma letra no representan diferencia estadística ($p>0,05$).

Figure 3. Number of live adults of *Anthonomus eugenii* according to *Beauveria* spp. strain and days after transplant (ddt). Fabio Baudrit Moreno Experimental Station, Alajuela, Costa Rica. 2023.

Means with the same letter do not represent a statistical difference ($p>0.05$).

ddt (61,47 y 47,80 frutos, respectivamente), con una concentración de daño mayor cada 15 días y una disminución drástica a los 78 ddt (11,87 frutos) (Figura 4).

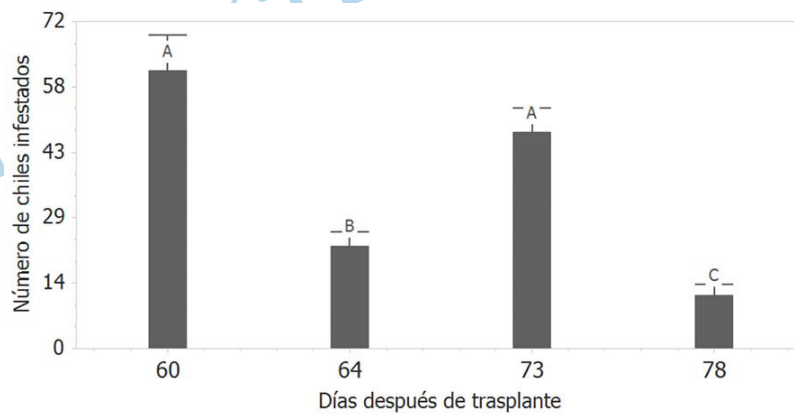


Figura 4. Promedio de chiles del híbrido 4212 infestados por *Anthonomus eugenii* según días después de trasplante (ddt). Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Alajuela, Costa Rica. 2023.

Medias con una misma letra no representan diferencia estadística ($p>0,05$).

Figure 4. Average number of hybrid sweet pepper 4212 infested by *Anthonomus eugenii* according to days after transplant (ddt). Fabio Baudrit Moreno Experimental Station, Alajuela, Costa Rica. 2023.

Means with the same letter do not represent a statistical difference ($p>0.05$).

Correlación entre variables

Hubo correlación positiva entre el promedio de chiles infestados en función del número de adultos vivos a los 64 ddt ($r=0,79$) y a los 73 ddt ($r=0,85$). Las cepas INTA H-168 e INTA H-149 obtuvieron los valores más bajos de número de adultos vivos y número de chiles caídos con respecto al testigo (Figura 5).

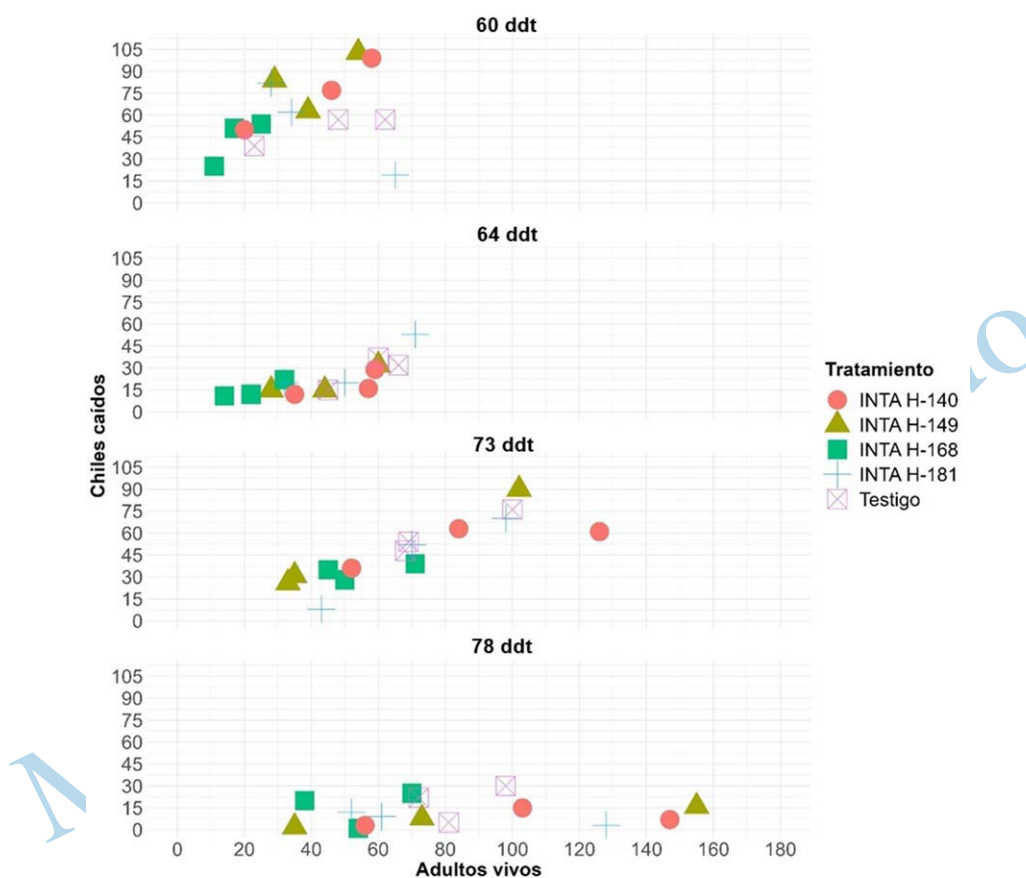


Figura 5. Análisis de correlación de número de adultos vivos y chiles del híbrido 4212 infestados (caídos) por daño interno de larvas de *Anthonomus eugenii*, según días después de trasplante (ddt) y tratamiento. Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Alajuela, Costa Rica 2023.

Figure 5. Correlation analysis of the number of live adults and peppers of hybrid 4212 infested (fallen) due to internal damage by *Anthonomus eugenii* larvae, according to days after transplant (ddt) and treatment. Fabio Baudrit Moreno Experimental Station, Alajuela, Costa Rica. 2023.

Parasitismo

Los cadáveres parasitados fueron llevados al laboratorio y se comprobó la presencia de *Beauveria* spp en todas las muestras extraídas. Todas las cepas evaluadas (INTA H-140, INTA H-149, INTA H-168 y INTA H-181)

mostraron parasitismo luego de los 78 ddt (Figura 6). El parasitismo observado se caracterizó por la presencia de micelio color blanquecino, visible al inicio inicialmente en las patas del adulto, el cual se extendió por todo el cuerpo hasta cubrirlo por completo. Se identificaron cadáveres de adultos jóvenes.



Figura 6. Cadáveres de adultos de *Anthonomus eugenii* parasitados por cepa de *Beauveria* spp. INTA H-168. Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno. Foto: Cristina Vargas, 2023.

Figure 6. Cadavers of adult *Anthonomus eugenii* parasitized by *Beauveria* spp. strain INTA H-168. Fabio Baudrit Moreno Experimental Station. Photo: Cristina Vargas, 2023.

Discusión

La germinación conidial y sobrevivencia de *Beauveria* spp. es afectada por la temperatura y la humedad; la influencia de estas variables, se han estudiado en condiciones *in vitro*, sin embargo, su extrapolación a invernadero o campo se ve limitada por la influencia de múltiples interacciones bióticas y abióticas en el trópico (McGuire & Northfield, 2020; Seid et al., 2019). La temperatura media diaria en este experimento obtenida fue de 25,80 °C, considerada como favorable para garantizar el desempeño de las cepas, sin embargo, durante el periodo de evaluación se registraron temperaturas de 38,90 °C (Figura 2); que, según Mann y Davis (2019) y Quesada-Moraga et al. (2023), no son propicias para expresar el potencial biocontrolador y de virulencia real de las cepas estudiadas.

Otra variable que afecta a *Beauveria* spp. es la humedad relativa (Quesada-Moraga et al., 2023). El promedio obtenido fue de 78,19 %, sin embargo, se registraron valores de hasta 31,30 %, considerado bajos para el desarrollo del hongo. La humedad cercana al 97 % incentiva la germinación de este hongo (Saranraj & Jayaprakas, 2017), mientras que, el rango óptimo es entre un 90 % y 97 % (Quesada-Moraga et al., 2023). Además, un estudio realizado por Shipp et al. (2003) en invernadero para el control de diferentes insectos en el cultivo de pepino, determinó una mayor tasa de infección de *Beauveria* spp. cuando la humedad relativa fue cercana a los 91,65 %, en comparación con humedad relativa de 77,09 %.

Las condiciones de temperatura y humedad relativa no fueron favorables en algunos días durante la evaluación (Moraga et al., 2023; Saranraj & Jayaprakas, 2017; Shipp et al., 2003), no obstante, se evidenció parasitismo en cuatro tratamientos de *Beauveria* spp. en la cuarta evaluación 25 días después de la primera aplicación. Esta situación evidencia la necesidad de mejorar las condiciones internas de temperatura y humedad relativa del invernadero para futuras investigaciones cuando las hifas del hongo atraviesan el tegumento del insecto, el hongo demuestra su capacidad entomopatógena, esto se comprueba con el micelio expuesto observado en el cadáver en este experimento (Esparza Mora et al., 2017). Lo anterior sugiere que su accionar es lento como alternativa de control y determina la importancia de un manejo integrado de cultivo (Adeleye et al., 2022; Fernández et al., 2020).

Las cepas INTA H-149 e INTA H-168 mostraron un desarrollo de micelio, en contraste con los hallazgos previos de laboratorio, donde provocaron una mortalidad del 100 % a los 6 días de la inmersión, pero no se observó crecimiento micelial (Vargas, 2021). La posterior aparición de más adultos parasitados, evidencia la persistencia del hongo por hasta dos meses luego de finalizadas las evaluaciones, lo cual coincide con lo reportado por Ricaño et al. (2013) quienes al evaluar dos cepas de *B. bassiana* en condiciones de campo para el combate de *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae) observaron la permanencia del hongo durante tres meses.

Los adultos manifestaron un comportamiento a entrar en contacto con los adultos parasitados; esta conducta fue observada durante el proceso de evaluación y sugiere una ventaja para propiciar la infestación, ya que según Altinok Handan et al. (2019), el mecanismo de contacto resulta eficiente para la diseminación de las esporas del hongo a otros adultos. Es recomendable indagar el efecto de estas cuatro cepas en concentraciones superiores a 1×10^8 conidias/ml, lo cual es propuesto en otras investigaciones donde citan que a mayor concentración mayor efecto biocontrolador (Giometti et al., 2020; Labbé et al., 2020; Ricaño et al., 2023). Los estudios efectuados por Labbé et al. (2020) sobre el efecto de este hongo sobre *Anthonomus eugenii* mostraron efectividad de control a concentraciones superiores a $2,8 \times 10^7$ conidias/ml, mientras que, Giometti et al. (2020) indican potencial biocontrolador a 1×10^8 conidias/ml.

La interacción entre el análisis de adultos vivos según fecha (ddt) mostró una reducción de la población de *Anthonomus eugenii* en las primera dos evaluaciones al utilizar la cepa INTA H-168, lo cual es un indicador del potencial biocontrolador de la cepa que debe ser estudiado. Hubo altas concentraciones de chiles infestados cada quince días; luego de cada aumento se contabilizó un descenso en el número de frutos con daño. Lo anterior concuerda con lo reportado por Wu et al. (2019), quienes al evaluar los niveles de infestación de *Anthonomus eugenii* en frutos de chile jalapeño, obtuvieron un comportamiento similar al contabilizar tres aumentos de infestación durante su evaluación seguido cada uno de una disminución considerable de frutos.

Conclusiones

La reducción significativa de adultos vivos en las dos primeras evaluaciones de la cepa INTA H-168 y su parasitismo, evidencia un potencial biológico para el control de *Anthonomus eugenii*. Es necesario ampliar los estudios de la cepa INTA H-168 a mayores concentraciones (más de 1×10^8 conidias/ml) y mayor número de aplicaciones semanales.

Referencias

- Adeleye, V. O., Seal, D. R., Liburd, O. E., McAuslane, H., & Alborn, H. (2022). Pepper weevil, *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) suppression on jalapeño pepper using non-host insect repellent plants. *Crop Protection*, 154, Article 105893. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105893>
- Alali, S., Mereghetti, V., Faoro, F., Bocchi, S., Al Azmeh, F., & Montagna, M. (2019). Thermotolerant isolates of *Beauveria bassiana* as potential control agent of insect pest in subtropical climates. *PLoS ONE*, 14(2), Article e0211457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211457>
- Altinok Handan, H., Altinok Mahmut, A., & Koca Abdurrahman, S. (2019). Modes of action of Entomopathogenic fungi. *Current Trends in Natural Sciences*, 8(16), 117-124. <https://natsci.upit.ro/issues/2019/volume-8-issue-16/modes-of-action-of-entomopathogenic-fungi/>

- Borisade, O. A., & Magan, N. (2014). Growth and sporulation of entomopathogenic *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa* and *Isaria fumosorosea* strains in relation to water activity and temperature interactions. *Biocontrol Science and Technology*, 24(9), 999-1011. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.909007>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2018). *Infostat* (Versión 2020). Centro de Transferencia Infostat. <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=15>
- Esparza Mora, M. A., Conteiro Castilho, A. M., & Fraga, M. E. (2017). Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico*, 84(1-10), Article e0552015. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000552015>
- Espinoza-Castillo, D. F., Aragón-Sánchez, M., Aragón-García, A., Rodríguez-Leyva, E., & Rivera-Landa, M. del R. (2023). Monitoreo y fluctuación poblacional de parasitoides del picudo del chile *Anthonomus eugenii* (Cano, 1894) (Coleóptera: Curculionidae) en una zona productora de Puebla, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 39, 1–9. <https://doi.org/10.21829/azm.2023.3912568>
- Fernández, D. C., VanLaerhoven, S. L., McCreary, C., & Labbé, R. M. (2020). An Overview of the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae) as a pest of greenhouse peppers. *Journal of Integrated Pest Management*, 11(1), Article 26. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmaa029>
- García-Carrucini, M. A., Cartín Leyva, V., & Estévez de Jensen, C. (2017). Hongos entomopatógenos nativos con potencial para el control del picudo del pimiento, *Anthonomus eugenii* Cano, en Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 101(1), 91-106. <https://revistas.upr.edu/index.php/jaupr/article/download/14296/11887/14086>
- Giometti, F. H. C., Wenzel, I. M. I., Almeida, J. E. M., Leite, L. G., & Zappellini, L. O. (2020). Selección de cepas de *Beauveria bassiana* para el control de adultos del picudo del algodón *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, 77(1), 167-169. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v77p1672010>
- Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. (2010). *Manejo integrado de Anthonomus eugenii Cano (Coleóptera: Curculionidae) en el cultivo de Ají*. [Folleto] Departamento de Ediciones y Publicaciones. <https://www.cabi.org/wp-content/uploads/Barba-2009a-IPM-Anthonomus-eugenii.pdf>
- Khun, K. K., Wilson, B. A. L., Stevens, M. M., Huwer, R. H., & Ash, G. J. (2020). Integración de hongos entomopatógenos en programas de MIP: Estudios con gorgojos (Coleoptera: Curculionoidea) que afectan a cultivos hortícolas. *Insects*, 11(10), Article 659. <https://doi.org/10.3390/insects11100659>
- Labbé, R. M., Gagnier, D., Rizzato, R., Tracey, A., & McCreary, C. (2020). Assessing new tools for management of the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae) in greenhouse and field pepper crops. *Economic Entomology*, 113(4), 1903–1912. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa092>
- Mann, A. J., & Davis, T. S. (2019). Plant secondary metabolites and low temperature are the major limiting factors for *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Ascomycota: Hypocreales) growth and virulence in a bark beetle system. *Biological Control*, 141, Article 104130. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104130>
- McGuire, A., & Northfield, T. (2020). Tropical occurrence and agricultural importance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, Article 6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00006>
- Ministerio de Ambiente y Energía. (s.f.). *Mapa de zonas de vida de Costa Rica*. Instituto Geográfico Nacional. Recuperado el 20 de enero, 2023, de <https://bit.ly/3Zrn65p>

- Moldovan, A., Munteanu, N., & Toderas, I. (2022). Temperature effects on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* strain CNMC-FE-01: Vegetative growth, sporulation, germination rate. *Current trends in Natural Sciences*, 11(21), 332-338. <https://doi.org/10.47068/ctns.2022.v11i21.036>
- Mwamburi, L. A., Laing, M. D., & Miller, R. M. (2015). Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 67-74. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120131077>
- Nussenbaum, A. L. (2014). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates virulent for the control of the weevil, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) [Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires]. Red de Repositorios Latinoamericanos. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis_n5511_Nussenbaum
- Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., & De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860.
- Quesada-Moraga, E., González-Mas, Natalia., Yousef-Yousef, M., Garrido-Jurado, I., & Fernández-Bravo. (2023). Key role of environmental competence in successful use of entomopathogenic fungi in microbial pest control. *Journal of Pest Science*, 97, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s10340-023-01622-8>
- Ricaño, J., Güerri-Agulló, B., Serna-Sarriás, M., Rubio-Llorca, G., Asensio, L., Barranco, P., & López-Llorca, L. V. (2013). Evaluation of the pathogenicity of multiple isolates of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae) for the assessment of a solid formulation under simulated field conditions. *Florida Entomologist*, 96(4), 1311-1324. <https://doi.org/10.1653/024.096.0410>
- Rossini, L., Contarini, M., Severini, M., Talano, D., & Speranza, S. (2020). A Modelling approach to describe the *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) life cycle in plant protection: A priori and a posteriori analysis. *Florida Entomologist*, 103(2), 259-263. <https://doi.org/10.1653/024.103.0217>
- Saranraj, P., & Jayaprakas, A. (2017). Agrobenevolent entomopathogenic fungi-*Beauveria bassiana*: A review. *Indo-Asian Journal of Multidisciplinary Research*, 8(2),1051-1087. <https://doi.org/10.22192/iajmr.2017.3.2.4>
- Seid, A. Md., Fredensborg, B. L., Steinwender, B. M., & Meyling, N. V. (2019). Temperature-dependent germination, growth and co-infection of *Beauveria* spp. isolates from different climatic regions. *Biocontrol Science and Technology*, 29(5), 411-426. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1564812>
- Servicio Fitosanitario del Estado. (2023). *Resultados obtenidos en los análisis realizados en vegetales frescos para verificar el cumplimiento de los límites máximos de residuos de plaguicidas*. https://www.sfe.go.cr/DocsResiduosAgroquim/Informe_Analisis_de_Residuos_2022.pdf
- Sharma, A., Sharma, S., & Kumar Yadav, P. (2023). Entomopathogenic fungi and their relevance in sustainable agriculture: a review. *Cogent Food & Agriculture*, 9, Article 2180857. <https://doi.org/10.1080/23311932.2023.2180857>
- Shipp, J. L., Zhang, Y., Hunt, D.W.A., & Ferguson, G. (2003). Influence of humidity and greenhouse microclimate on the efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) for control of greenhouse arthropod pests. *Environmental Entomology*, 32(5), 1154-1163. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.5.1154>
- Steiner, A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil*, 15(2), 134-154. <https://edepot.wur.nl/309364>

- Torres-Ruiz, A., & Rodríguez-Leyva, E. (2019). *Guía para el manejo integrado de plagas del pimiento bajo invernadero, con énfasis en el picudo del chile*. Koppert México S.A. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2688.4009>
- Van der Gaag, D. J., Schenk, M., Loomans, A., Delbianco, A., & Vos, S. (2020). Tarjeta de estudio de plagas en *Anthonomus eugenii*. *European Food Safety Authority (EFSA)*, 17(6), Article 1887E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2020.EN-1887>
- Vargas, C. (2021). Evaluación *in vitro* de hongos entomopatógenos en el control biológico del picudo del chile dulce *Anthonomus eugenii* Cano. *Alcances tecnológicos* 16(1), 44-52. http://revista.inta.go.cr/index.php/alcances_tecnologicos/index
- Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P., & Gong, M. (2021). The toxins of *Beauveria bassiana* and the strategies to improve their virulence to insects. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 705343. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705343>
- Wu, Pengxiang., Haseeb, M., Diedrick, W., Ouyang, H. Zhang, R., Kanga, L., & Legaspi, J. (2019). Influence of plant direction, layer and spacing on the infestation levels of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) in open jalapeño pepper fields in North Florida. *Florida Entomologist*, 102(3), 501-508. <https://doi.org/10.1653/024.102.0319>

Manuscrito aceptado